

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

EP 00/5254



21/12

396

10/009854

4

#

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

REC'D 05 JUL 2000	
WIPO	PCT

Aktenzeichen: 199 26 475.9

Anmeldetag: 10. Juni 1999

Anmelder/Inhaber: KTB Tumorforschungsgesellschaft mbH, Freiburg im Breisgau/DE

Bezeichnung: Träger-Pharmaka-Konjugate

IPC: A 61 K 47/08

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 20. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Brand

Anmelder: KTB Tumorforschung GmbH
"Träger-Pharmaka-Konjugate"
Unser Zeichen: K 2573 - py / js

A28000101

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Träger-Pharmaka-Konjugate, sowie Verfahren zu deren Herstellung und Arzneimittel, welche die Konjugate enthalten.

5 Der Großteil der zur Zeit eingesetzten Pharmaka sind niedermolekulare Verbindungen und weisen nach systemischer Applikation eine hohe Plasma- sowie Gesamtclearance auf. Desweiteren dringen sie aufgrund von Diffusionsvorgängen in die Gewebestrukturen des Körpers ein und weisen in der Regel eine gleichmäßige Bioverteilung auf. Beide Eigenschaften führen dazu, daß nur geringe Mengen des Pharmakons den Wirkort erreichen und das Pharmakon
10 aufgrund seiner Verteilung auf das gesunde Gewebe des Körpers Nebenwirkungen hervorruft. Diese Nachteile sind besonders bei solchen Pharmaka ausgeprägt, die ein hohes zytotoxisches Potential besitzen, wie etwa Zytostatika oder Immunsuppressiva.

15 Aus diesem Grund wird nach neuen Derivaten bzw. Formulierungen gesucht, die eine selektivere Therapie ermöglichen. Zu diesem Zwecke werden Chemoimmunokonjugate bzw. Protein- oder Polymerkonjugate, bestehend aus einer geeigneten Trägersubstanz und einem Pharmakon, entwickelt.

20 Zum Stand der Technik auf diesem Gebiet sind Polymerkonjugate zu nennen, bei denen Zytostatika an Serumproteine, Antikörper, Wachstumsfaktoren, hormon- bzw. peptidähnliche Strukturen oder an synthetische Polymere gekoppelt sind (Mägerstädt, M.: Antibody Conjugates and Malignant Disease, Library of Congress 1990; Seymour, L.W. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1992), 9, 135-
25 187; Maeda, H.; Matsumura, Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1989), 6, 193-210).

Aus DE-A-41 22 210 sind Konjugate tumoraktiver Verbindungen mit Albumin

2

bekannt, wobei die tumoraktive Verbindung mit N-Hydroxysuccinimid und Carbodiimid aktiviert und das so erhaltene Gemisch direkt an das Trägerprotein gekoppelt wird. Nachteile dieser Konjugate liegen u.a. darin, daß sie nicht in der erforderlichen hohen Reinheit gewonnen werden können, die native Struktur des Albumins aufgrund der Herstellungsverfahren oft nicht erhalten bleibt und das stöchiometrische Verhältnis von Pharmakon zu Albumin nicht konstant und schlecht reproduzierbar ist. Desweiteren ermöglichen es diese Konjugate nicht, daß sie in geeigneter Weise im Zielgewebe bzw. in den Zielzellen freigesetzt werden können.

10

Daher liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, neue Träger-Pharmaka-Konjugate bereitzustellen, welche die Nachteile der im Stand der Technik bekannten Konjugate überwinden.

15

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gelöst.

20

Insbesondere wird ein Träger-Pharmakon-Konjugat bereitgestellt, umfassend einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren Cystein-Resten, und ein Pharmakon, enthaltend eine pharmazeutisch aktive Substanz, ein Spacermolekül und eine thiolbindende Gruppe, wobei pro Mol Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Träger gebunden sind. Der Ausdruck "pharmazeutisch aktive Substanz" bedeutet, daß die betreffende Substanz entweder selbst oder nach ihrer Umsetzung durch den Stoffwechsel im jeweiligen Organismus eine pharmakologische Wirkung hervorruft und umfaßt somit auch die sich durch diese Umsetzungen ergebenden Derivate. Selbstverständlich kann die pharmazeutisch aktive Substanz ein einzelnes (beispielsweise nur als Zytostatikum) oder ein breites (beispielsweise als Zytostatikum und als Antiphlogistikum usw.) pharmakologisches Wirkspektrum aufweisen.

30

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist der Träger natives oder rekombinantes Albumin.

Das Pharmakon bzw. das Pharmakonderivat im erfindungsgemäßen Konjugat läßt sich beispielsweise durch das folgende Schema darstellen (PAS, pharmazeutisch aktive Substanz; SM, Spacermolekül; TG, thiolbindende Gruppe):



Das erfindungsgemäße Konjugat stellt eine Transport- und/oder Depotform der pharmazeutisch aktiven Substanz dar, die so gezielt bzw. in dosierter Form die Zielzellen bzw. das Zielgewebe des Pharmakons erreicht. Gegenüber den bisher bekannten Konjugaten können die Konjugate der vorliegenden Erfindung in einer höheren Reinheit gewonnen werden, die native Struktur des Trägers bleibt erhalten und das stöchiometrische Verhältnis von Pharmakon zu Träger ist konstant und reproduzierbar.

Gegenüber den in DE-A-41 22 210 beschriebenen Albumin-Zytostatika-Konjugaten besitzt das erfindungsgemäße Konjugat weiterhin den Vorteil, daß zwischen der pharmazeutisch aktiven Substanz und der thiolbindenden Gruppe ein Spacermolekül vorhanden ist, das so maßgeschneidert ist, daß die pharmazeutisch aktive Substanz oder ein entsprechendes aktives Derivat hiervon im Zielgewebe bzw. in den Zielzellen pH-abhängig oder enzymatisch freigesetzt werden kann.

Träger wie beispielsweise Albumin bzw. deren Pharmaka-Konjugate weisen eine ausgesprochen lange Halbwertszeit im systemischen Kreislauf auf (bis zu 19 Tage - Peters, T. Jr. (1985): Serum albumin. *Adv. Protein. Chem.* 37, 161-245). Aufgrund einer erhöhten Permeabilität von Gefäßwänden des malignen, infizierten bzw. entzündeten Gewebes für Makromoleküle gelangt der Träger wie beispielsweise Serumalbumin bevorzugt in das Zielgewebe (Maeda, H.; Matsu-mura, Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1989), 6, 193-210). Dadurch kann ein an inen Träger, z.B. Albumin, gekoppelter Wirkstoff gezielter den Wirkort erreichen. Desweiteren verhindert das erfindungsgemäße Träger-Pharmakon-Konjugat, das die pharmazeutisch aktive Substanz in gesunde Gewebestrukturen

des Körpers diffundiert oder über die Niere eliminiert wird bzw. diese in dem Maße schädigt wie die nicht gebundene pharmazeutisch aktive Substanz. Dadurch wird das pharmakokinetische Profil der pharmazeutisch aktiven Substanz verändert und verbessert, da die Wirkung der pharmazeutisch aktiven Substanz durch eine Anreicherung am Wirkort erhöht wird und gleichzeitig die toxischen Wirkungen auf gesunde Systeme des Körpers verringert werden.

Das Konjugat der vorliegenden Erfindung besitzt eine ausgezeichnete Wasserlöslichkeit. Desweiteren zeigt das erfindungsgemäße Konjugat *in vivo* beispielsweise eine verbesserte antitumorale Wirksamkeit gegenüber der ungebundenen pharmazeutisch aktiven Substanz.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül pH-abhängig und/oder enzymatisch spaltbar. Vorzugsweise enthält das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül mindestens eine säurelabile Bindung. Beispiele säurelabiler Bindungen sind Ester-, Acetal-, Ketal-, Imin-, Hydrazon, Carboxylhydrazon- oder Sulfonylhydrazonbindungen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats enthält das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül mindestens eine Peptidbindung. Vorzugsweise liegt die Peptidbindung innerhalb einer Peptidsequenz vor, welche mindestens eine Spaltsequenz einer Protease enthält. Daher kann die mindestens eine Peptidbindung durch Einfügen einer Peptidsequenz in das Spacermolekül und/oder in die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder in die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül realisiert werden, d.h. die

jeweilige Verknüpfung ist eine Peptidbindung, und besteht vorzugsweise aus etwa 1 bis 30 Aminosäuren. Die Peptidsequenz ist dabei vorzugsweise auf die Substratspezifität bestimmter körpereigener Enzyme oder von Enzymen zugeschnitten, die in Mikroorganismen vorkommen bzw. von diesen gebildet werden. Dadurch wird die Peptidsequenz oder ein Teil dieser Sequenz im Körper von den Enzymen erkannt und das Peptid gespalten.

Die Enzyme sind beispielsweise Proteasen und Peptidasen, z.B. Matrix-Metalloproteasen (MMP) oder Cysteinproteasen, die bei Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Krebs verstärkt gebildet oder aktiviert sind, was zum exzessiven Gewebeabbau, zu Entzündungen und zur Metastasierung führt. Targetenzyme sind insbesondere MMP 2, MMP 3 und MMP 9, die als Proteasen bei den genannten pathologischen Prozessen beteiligt sind (Vassalli, J., Pepper, M.S. (1994), *Nature* 370, 14-15, Brown, P.D. (1995), *Advan. Enzyme Regul.* 35, 291-301).

Weitere Proteasen, die Targetenzyme für Konjugate der vorliegenden Erfindung darstellen, sind Cathepsine, insbesondere Cathepsin B und H, die als Schlüsselenzyme bei entzündlichen und malignen Erkrankungen identifiziert worden sind (T. T. Lah et al. (1998), *Biol. Chem.* 379, 125-301).

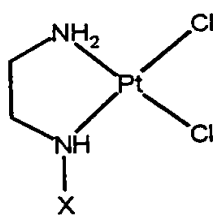
Beide Bindungstypen – säurelabile Bindung bzw. Peptidbindung – gewährleisten, daß die pharmazeutisch aktive Substanz oder ein entsprechend aktives Derivat am Wirkort extrazellulär und/oder intrazellulär gespalten wird und seine pharmazeutische Wirkung entfalten kann.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die pharmazeutisch aktive Substanz ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein Immunsuppressivum, ein Antirheumatikum, ein Antiphlogistikum oder ein Antimytikum. Besonders geeignete Zytostatika der Konjugate der vorliegenden Erfindung sind die N-Nitrosoharnstoffe wie Nimustin, die Anthrazykline Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitoxantron und Ametantron sowie verwandte Derivate, die Alkylantien Chlorambucil, Bendamustin, Melphalan und Oxazaphosphorine sowie verwandte

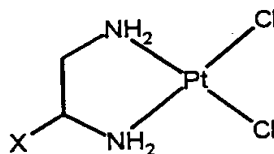
Derivate, die Antimetabolite Methotrexat, 5-Fluorouracil, 5'-Desoxy-5-fluorouridin und Thioguanin sowie verwandte Derivate, die Taxane Paclitaxel und Docetaxel sowie verwandte Derivate, die Camptothecine Topotecan, Irinotecan, 9-Aminocamptothecin und Camptothecin sowie verwandte Derivate, die Podophylotoxinderivate Etoposid, Teniposid und Mitoposid sowie verwandte Derivate, die Vinca-Alkaloide Vinblastin, Vincristin, Vindesin und Vinorelbin sowie verwandte Derivate und eine Verbindung der allgemeinen Formel I bis XII:

10

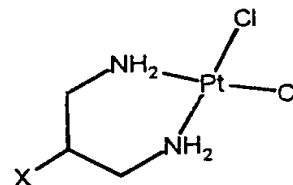
15



Formel I

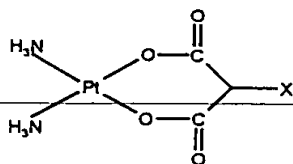


Formel II

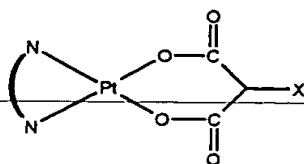


Formel III

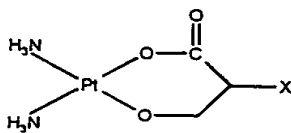
Formel IV



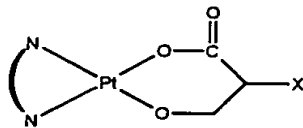
Formel V



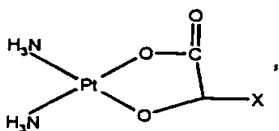
Formel VI



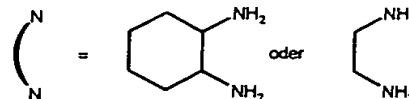
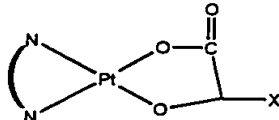
Formel VII



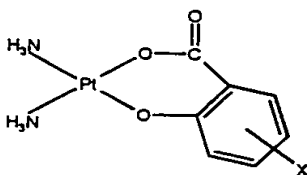
Formel IX



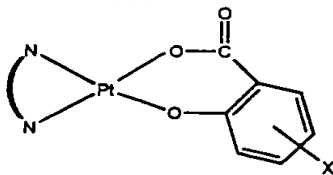
Formel X



Formel XI



Formel XII



wobei X das Spacermolekül oder die thiolbindende Gruppe ist.

Besonders geeignete Zytokine in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Interleukin 2, Interferon α -2a, Interferon α -2b, Interferon β -1a, Interferon β -1b, Interferon γ -1b und verwandte Derivate. Die verwendeten Zytokine sind i.d.R. gentechnisch hergestellte Arzneimittel.

Besonders geeignete Immunsuppressiva in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Cyclosporin A, FK 506 und verwandte Derivate.

Besonders geeignete Antirheumatika in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Methotrexat und verwandte Derivate.

Besonders geeignete Antiphlogistika in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Salicylsäurederivate, wie etwa Acetylsalicylsäure und verwandte Derivate, Pharmaka-Derivate, die eine Essig- oder Propionsäuregruppe aufweisen, wie etwa Diclofenac bzw. Indometacin oder Ibuprofen bzw. Naproxen, und Aminophenolderivate, wie etwa Paracetamol.

Besonders geeignete Antimykotika in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Amphotericin B und verwandte Derivate.

10

Selbstverständlich kann im erfindungsgemäßen Konjugat pro Mol eine einzelne Pharmakonspezies (beispielsweise ein Pharmakon mit einem Zytostatikum als pharmazeutisch aktiver Substanz) oder unterschiedliche Pharmakonspezies (beispielsweise mehrere unterschiedliche Zytostatika oder ein Zytostatikum und ein Antiphlogistikum usw. als pharmazeutisch aktive Substanz) gebunden vorliegen.

15

20

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats umfaßt das Spacermolekül einen substituierten oder unsubstituierten, verzweigt- oder unverzweigt-kettigen aliphatischen Alkylrest mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen und/oder mindestens einen substituierten oder unsubstituierten Arylrest.

25

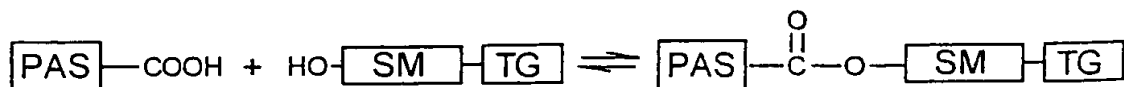
In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats umfaßt die thiolbindende Gruppe eine Maleinimidgruppe, eine Halogenacetamidgruppe, eine Halogenacetatgruppe oder eine Pyridyldithio-Gruppe, die gegebenenfalls substituiert sind.

30

Das Pharmakon oder Pharmakaderivat der erfindungsgemäßen Konjugate kann je nach der vorliegenden funktionellen Gruppe gemäß einer der folgenden allgemeinen Beschreibungen hergestellt werden.

Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine HOOC-Gruppe besitzen, können beispielsweise folgendermaßen derivatisiert

werden:



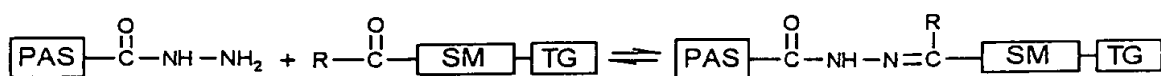
5

Die Veresterung erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

10

Es ist weiterhin möglich, die HOOC-Gruppe in eine Hydrazidgruppe zu überführen, z.B. durch Umsetzen mit tert.-Alkylcarbazaten und anschließende Spaltung mit Säuren (beschrieben in DE-A-196 36 889), und das eine Hydrazidgruppe aufweisende Pharmakon mit einer eine Carbonylkomponente enthaltenden Gruppe, bestehend aus der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül, umzusetzen, wie u.a. in DE-A-196 36 889 beschrieben ist:

15

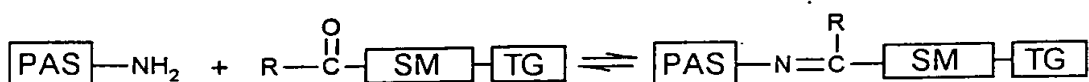


R = H, Alkyl, Phenyl, substituiertes Phenyl

20

Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine H₂N-Gruppe besitzen, können beispielsweise folgendermaßen derivatisiert werden:

25



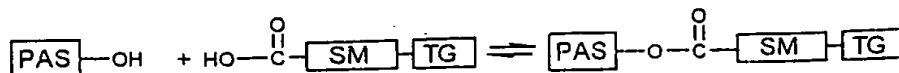
R = H, Alkyl, Phenyl, substituiertes Phenyl

30

Die Reaktion zu den Iminderivaten erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

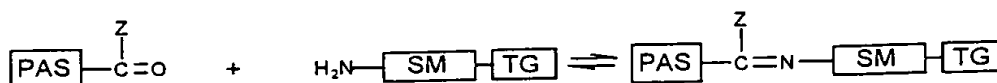
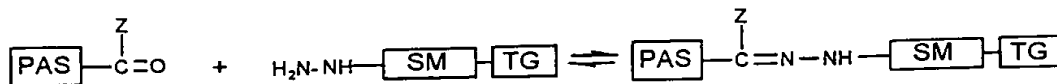
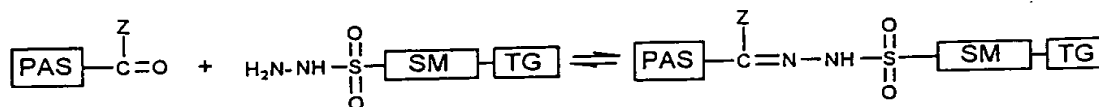
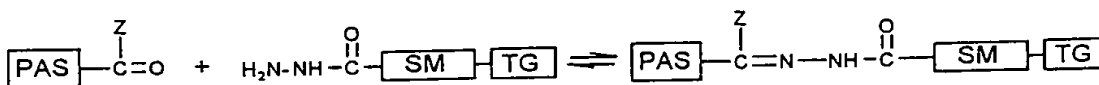
10

Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine HO-Gruppe besitzen, können beispielsweise folgendermaßen derivatisiert werden:



Die Veresterung erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine Carbonylkomponente besitzen, können beispielsweise folgendermaßen derivatisiert werden:



Z = chemische Gruppe der pharmakologisch aktiven Substanz

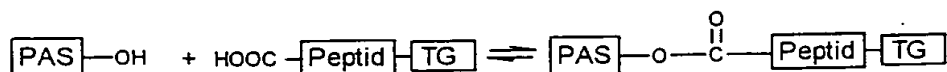
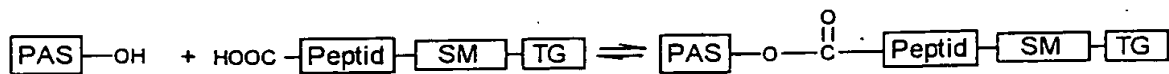
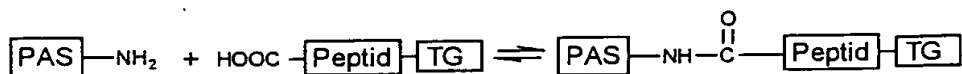
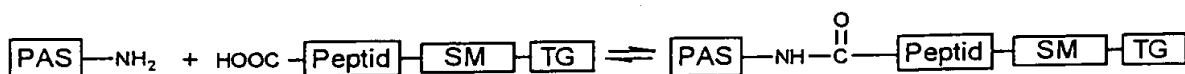
Die Umsetzung zu den Carboxyhydrazon-, Sulfonylhydrazon-, Hydrazon- bzw. Iminderivaten erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

Die Gruppen, die aus der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül bestehen, können beispielsweise gemäß Verfahren, die u.a. in DE-A-196 36 889, U. Beyer et al., 1997 (*Chemical Monthly*, 128, 91, 1997), R.S. Greenfield et al.,

1990 (*Cancer Res.*, 50, 6600, 1990), T. Kaneko et al., 1991 (*Bioconjugate Chem.*, 2, 133, 1991), Bioconjugate Techniques (G.T. Hermanson, Academic Press, 1996) oder im US-Patent 4,251,445 beschrieben sind, hergestellt werden.

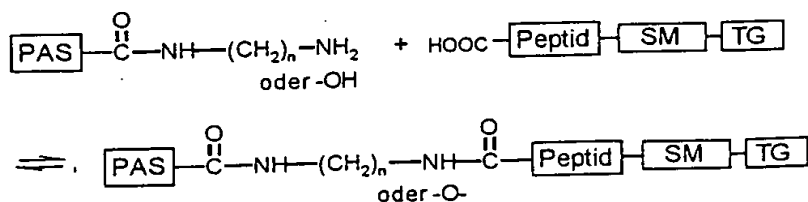
Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine Peptidbindung enthalten, können beispielsweise dadurch hergestellt werden, daß ein Peptid, das aus 2 bis etwa 30 Aminosäuren besteht, mit einer thiolbindenden Verbindung umgesetzt wird, so daß eine thiolbindende Gruppe direkt oder über ein Spacermolekül am N-terminalen Ende des Peptids eingeführt wird.

Die so erhaltenen Peptidderivate können mit Pharmaka oder Pharmakaderivaten, die eine H₂N- oder HO-Gruppe besitzen, in der Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie zum Beispiel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluol-sulfonat (CMC), und gegebenenfalls unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid oder eines wasserlöslichen N-Hydroxysuccinimids, wie etwa des Natriumsalzes der N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure, zu den entsprechenden thiolbindenden Pharmaka-Peptidderivaten umgesetzt werden:

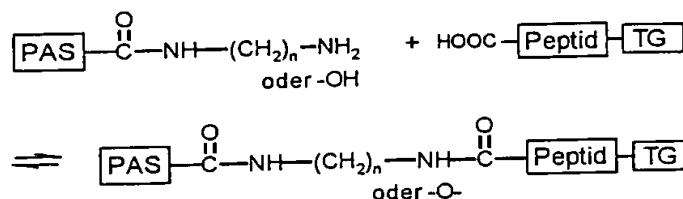


Es ist weiterhin möglich, über die HOOC-Gruppe der Pharmaka der erfindungsgemäßen Konjugate eine H₂N- oder HO-Gruppe einzuführen, beispielsweise durch Derivatisierung über die α -Aminogruppe der Aminosäuren Lysin, Serin oder Threonin oder mit einer Diaminoverbindung der allgemeinen Formel H₂N-(CH₂)_n-NH₂ oder einem Alkoholamin der allgemeinen Formel H₂N-(CH₂)_n-OH mit n = 1 bis 12, und diese Derivate im Anschluß mit den oben genannten Peptidderivaten zu den entsprechenden thiolbindenden Pharmaka-Peptidderivaten umzusetzen:

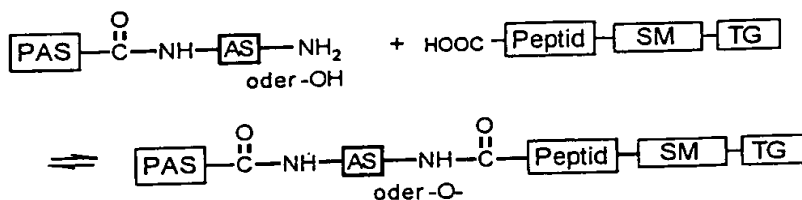
10



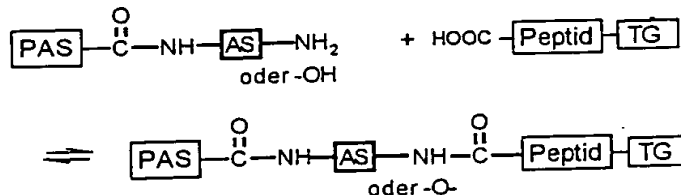
15



20



25



AS = Lysin, Serin oder Threonin

30

Die Substratspezifität von Targetenzymen, wie etwa von MMP 2, MMP 3, MMP 9, Cathepsin B und H, ist bekannt (Netzel-Arnett et al. (1993), *Biochemistry* 32, 6427-6432, Shuja, S., Sheahan, K., Murnane, M.J. (1991), *Int.J.Cancer* 49, 341-346, Lah, T.T., Kos, J. (1998), *Biol. Chem.* 379, 125-130).

5

Beispielsweise sind Octapeptide ($P_4 - P'_4$) für MMP 2 und MMP 9 (siehe Tabelle 1) identifiziert worden, welche die Spaltsequenz der Kollagenkette simulieren, und besonders effizient von MMP 2 und 9 gespalten werden (Aminosäuren sind im folgenden entsprechend dem internationalen Dreibuchstabencode abgekürzt):

10

Tabelle 1:

Peptid							
P_4	P_3	P_2	P_1	P'_1	P'_2	P'_3	P'_4

Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln							
Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln							

15

(Netzel-Arnett et al., *Biochemistry* 32, 1993, 6427-6432)

20

Die Peptide werden ausschließlich an der $P_1 - P'_1$ -Bindung enzymatisch gespalten.

25

Desweiteren sind bei Cathepsin B substratspezifische Dipeptide bekannt mit der Sequenz -Arg-Arg- oder -Phe-Lys- (Werle, B., Ebert, E., Klein, W., Spiess, E. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 157-164; Ulrich, B., Spiess, E., Schwartz-Albiez, R., Ebert, W. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 404-414).

30

Die Peptidsequenz, welche die für das Targetenzym relevante Peptidsollbruchstelle enthält, kann auch so aufgebaut sein, daß die Peptidsollbruchstelle mehrfach wiederholt wird, wie beispielsweise durch:

-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln

oder

-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-

5 oder es kann eine repetitive Peptidsequenz integriert werden, die den Abstand zwischen der thiolbindenden Gruppe und der relevanten Peptidsollbruchstelle vergrößert, wie beispielsweise durch:

-(Gly)_n-Phe-Lys-Phe-Lys-

10

mit vorzugsweise $n = 2$ bis 20, mehr bevorzugt $n \leq 12$.

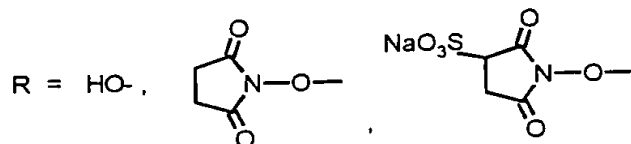
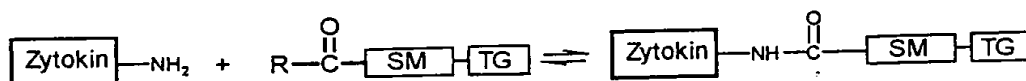
15

Ein wichtiges Merkmal dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist die Tatsache, daß die für das jeweilige Targetenzym relevante Peptidsollbruchstelle mindestens einmal in einem Oligopeptid, bestehend aus etwa 1 bis 30 Aminosäuren, vorkommt. Die oben aufgeführten Oligopeptide sind repräsentative Beispiele für die enzymatisch spaltbare Bindung in den erfindungsgemäßen Konjugaten und schränken die Erfindung nicht ein.

20

Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die ein Zytokin enthalten, können beispielsweise dadurch hergestellt werden, daß das Zytokin mit einem eine thiolbindende Gruppe enthaltenen Spacermolekül, das eine Carbonsäure oder eine aktivierte Carbonsäure aufweist, umgesetzt wird:

25



30

Weist das Spacermolekül eine N-Hydroxysuccinimidester-Gruppe (N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure, Natriumsalz) auf, wird es direkt mit dem Zytokin umgesetzt. Die Umsetzung des Zytokins mit einem thiolbindenden Gruppe enthaltenen Spacermolekül, das eine Carbonsäure aufweist, erfolgt in der Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie zum Beispiel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat (CMC), und gegebenenfalls unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid oder dem Natriumsalz der N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure, zu den entsprechenden thiolbindenden Zytokinderivaten. Die Aufreinigung der so derivatisierten Zytokine erfolgt in der Regel mit Hilfe der Ausschlußchromatographie. Die oben beschriebenen Umsetzungen sind einem Fachmann geläufig (siehe z.B. Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson, Academic Press, 1996).

Die oben beschriebenen Pharmaka oder Pharmakaderivate werden an einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren Cystein-Resten wie beispielsweise natives oder rekombinantes Albumin, gekoppelt, so daß im erfindungsgemäßen Konjugat pro Mol Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Träger gebunden sind. Enthält die Polypeptidsequenz des Trägers n (beispielsweise 3) Cystein-Reste, so bedeutet dies, daß 1 Mol dieses Trägers n (beispielsweise 3) Mol Cystein-Reste enthält und daher pro Mol des entsprechenden Konjugats maximal n (beispielsweise 3) Mol Pharmakon an den Träger gebunden vorliegen können. Im Idealfall sind im erfindungsgemäßen Konjugat daher 100% der im Träger vorhandenen Cystein-Reste über die thiolbindende Gruppe mit einem Pharmakon verbunden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung eines wie oben definierten Konjugats, umfassend

- (i) Behandlung des Trägers mit einem Reduktionsmittel, so daß mehr als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Rest im Träger vorliegen und
- (ii) Kopplung des Pharmakons über die thiolbindende Gruppe an die Cystein-

SH-Gruppen im Träger.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das zur Behandlung des Trägers verwendete Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT), Dithioerythritol (DTE) oder Mercaptoethanol. Das besonders bevorzugte Reduktionsmittel ist DTT.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der Erkenntnis, daß die im Stand der Technik bekannten Träger in einem inhomogenen Oxidationsstatus vorliegen. Beispielsweise lassen sich im Fall des im Handel erhältlichen nativen Albumins in der Regel mit dem photometrischen Essay nach Ellmann $\approx 0,2$ bis $0,7$ Mol HS-Gruppen pro Mol Cystein-Reste im Albumin nachweisen, d.h. das Cystein-34 ist häufig durch schwefelhaltige Verbindungen, wie etwa Cystein oder Glutathion, über eine Disulfidbindung oxidiert. Das bedeutet, daß die im Albumin vorhandenen Cystein-SH-Gruppen zumindest häufig nicht frei vorliegen, was bisher dazu führte, daß die Ausbeute an hergestellten Konjugaten zu gering und/oder stark schwankend von Albumin- zu Albumincharge war.

Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß im Handel erhältliche Träger mit einem Reduktionsmittel behandelt werden können, wobei die durch Disulfidbindungen oxidierten Cysteingruppen reduziert werden, so daß mehr als $0,7$ Mol Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Reste im Träger vorliegen. Die Reaktion wird vorzugsweise so gesteuert, daß mindestens $0,9$ Mol Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Rest im Träger verfügbar werden.

Die Umsetzung des Reduktionsmittels mit einem im Handel erhältlichen Träger, z.B. Albumin, erfolgt beispielsweise in einem Salzpuffer, z.B. in $0,01$ M Natriumborat, $0,15$ M NaCl, $0,001$ M EDTA oder $0,15$ M NaCl, $0,004$ M Phosphat in einem pH-Bereich von $5,0$ bis $8,0$, vorzugsweise von $6,0$ bis $7,0$. Das Reduktionsmittel kann im Überschuß eingesetzt werden, vorzugsweise ist das Verhältnis von Reduktionsmittel zu Träger zwischen $0,5:1$ und $10:1$. Die Reaktionszeit beträgt zwischen 1 h und 96 h, vorzugsweise zwischen 6 h und 24 h.

Der mit dem Reduktionsmittel behandelte Träger wird z.B. durch Gelfiltration (beispielsweise Sephadex® G10 oder G25, Laufmittel: 0,004 M Phosphat, 0,15 M NaCl - pH 7,4) oder durch Ultrafiltration isoliert.

5 Die Konzentration an Träger nach erfolgter Gelfiltration wird durch den Extinktionskoeffizienten bei 280 nm, die Anzahl der eingeführten HS-Gruppen wird mit Ellmann's Reagenz bei 412 nm bestimmt. Die so isolierte Trägerlösung kann direkt für die Synthese der Konjugate eingesetzt werden. Es ist auch möglich, die Trägerlösung mit einem handelsüblichen Konzentrador aufzukonzentrieren oder zu lyophilisieren. Die isolierte Trägerlösung oder das Lyophilisat kann im Temperaturbereich von -78 bis +30 °C gelagert werden.

10 Die Kopplung der oben beschriebenen Pharmakaderivate an den Träger erfolgt beispielsweise bei Raumtemperatur. Dabei wird zu dem Träger, der sich in einem Salzpuffer (beispielsweise 0,15 M NaCl - pH 6,0 bis 8,0), der eventuell vorher entgast wurde, befindet, ein etwa 1,1- bis 10-facher Überschuß des wie oben beschrieben hergestellten Pharmakons (bezogen auf die Anzahl der vorhandenen HS-Gruppen im Träger), gelöst in einer minimalen Menge Lösungsmittel, beispielsweise DMF, Dimethylsulfoxid, Wasser, Salzpuffer, Ethanol, Methanol, Propylenglykol, Glycerin, Acetonitril oder THF (etwa 1 bis 10% des Volumens der Trägerprobe), gegeben. Es ist auch möglich, das Pharmakon als Festsubstanz zur Trägerlösung zu geben. Desweiteren kann es vorteilhaft sein, vor der Kopp-
15 lung einen Hilfsstoff, wie etwa eine Fettsäure oder ein Tryptophonatderivat, zur Trägerlösung zu geben. Nach einer Reaktionszeit zwischen 5 min und 48 h wird
20 die Lösung, falls erforderlich, zentrifugiert, und das gebildete Träger-Pharmakon-Konjugat wird durch anschließende Gelfiltration (beispielsweise Sephadex® G10 oder G25) in einem Salzpuffer, wie etwa 0,004 M Phosphat, 0,15 M NaCl - pH 6,0 bis 8,0, isoliert.

25 Die Reinheit des entstandenen Konjugats kann beispielsweise durch HPLC, z.B. durch Ausschlußchromatographie, überprüft werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen Konjugaten weisen die gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Konjugate eine Reinheit von mehr als

95% auf.

Die Lösung des so erhaltenen Konjugats kann mit einem handelsüblichen Konzentrator aufkonzentriert werden. Die Konjugate können in gelöster Form bei +1 bis +30 °C oder in gefrorener Form bei $T = 0\text{ °C}$ bis -78 °C gelagert werden. Desweiteren ist es möglich, die Lösung der Konjugate zu lyophilisieren und das Lyophilisat bei +30° bis -78 °C zu lagern.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Arzneimittel, enthaltend ein wie oben definiertes Konjugat, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Hilfsstoff und/oder ein Verdünnungsmittel. Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann bevorzugt zur Behandlung von Krebskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Viren oder Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien und/oder Pilze verursacht sind, verwendet werden.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1 (A) ist ein HPLC-Chromatogramm eines erfindungsgemäßen Konjugats (A-DOXO-HYD-C). Es ist die Absorption bei 495 nm gegen die Retentionszeit in min aufgetragen. (B) ist das entsprechende HPLC-Chromatogramm von im Handel erhältlichem nativem Albumin (Immuno GmbH).

Fig. 2 zeigt die graphische Darstellung der Gewichte und Volumen von Nieren und Nierentumoren (A) sowie der Gewichte von Lungen und die Anzahl der Lungenmetastasen (B) von Mäusen, bei denen ein Nierenkarzinom erzeugt wurde, und die den angegebenen Behandlungen ausgesetzt wurden (Kontrolle: keine Behandlung; Albumin-Kontrolle: natives Albumin; Doxo: Doxorubicin; A-DOXO-HYD-C: erfindungsgemäßes Konjugat). Zum Vergleich sind auch die Daten für Mäuse, denen keine Tumorzellen injiziert wurden, abgebildet (kein Tumor).

Das folgende Beispiel erläutert die vorliegende Erfindung näher, ohne sie einzuschränken.

BEISPIEL

5

Umsetzung von humanem Serumalbumin (HSA) mit Dithiothreitol (DTT)

10

Das Verfahren für die Behandlung von HSA mit einem Reduktionsmittel wird durch folgendes Beispiel genauer dargestellt: 2,0 g humanes Serumalbumin (10 ml einer 20%igen HSA-Lösung, Pharma Dessau) wird mit 10 ml Puffer A (0,004 M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl - pH 7,0) verdünnt und mit 100 μ l einer frisch hergestellten $0,036 \times 10^{-2}$ M DTT-Lösung (5,55 mg DTT gelöst in 100 μ l Puffer A) versetzt und das Reaktionsgefäß sanft während 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die Albuminlösung durch Gelfiltration (Säule 5,0

15 cm x 25,0 cm, Sephadex® G.25; Laufpuffer 0,004 M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl - pH 7,4) aufgereinigt. Die Proteinkonzentration nach erfolgter Gelfiltration wurde photometrisch bei 280 nm ($\epsilon(\text{HSA})_{280} = 35\,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ - $c[\text{HSA}] \approx 3,1 \times 10^{-4} \text{ M}$) und die Anzahl der eingeführten HS-Gruppen mit Ellmanns Reagenz bei 412 nm ($\epsilon_{412} = 13\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ - $c[\text{HS-Gruppen}] \approx 3,07 \times 10^{-4} \text{ M}$) bestimmt. Daher liegen im so behandelten HSA 0,99 Mol freie Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Rest vor. Das behandelte HSA wurde auf etwa $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ eingeeengt (Centriprep-10®) und direkt für die unten aufgeführte Koppelungsreaktion mit einem thiolbindenden Pharmakon der vorliegenden Erfindung verwendet.

20

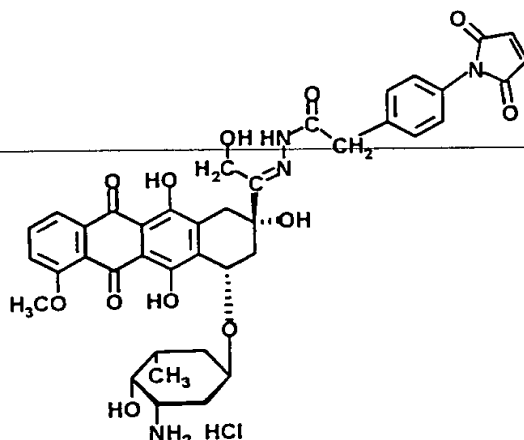
25

Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats A-DOXO-HYD-C

30

Das HSA-Doxorubicin-Konjugat (A-DOXO-HYD-C), bestehend aus gemäß obigem Beispiel mit DTT behandeltem HSA und einem Maleinimidophenyllessigsäurehydrazon-Derivat von Doxorubicin (DOXO-HYD), wurde weiterhin folgendermassen hergestellt.

Struktur von DOXO-HYD:



12 ml der mit DTT behandelten HSA-Probe (Sulfhydrylgehalt von 0,99 Mol pro Mol HSA) wurden mit 0,6 ml einer Lösung von DOXO-HYD (Mr 807,8) in DMF (12,5 mg gelöst in 0,6 ml DMF) versetzt und die Reaktionslösung während 18 h sanft geschüttelt. Das entstandene HSA-Doxorubicin-Konjugat wurde über eine Sephadex® G-25F Säule (Säule 5,0 cm x 25 cm) isoliert (Retentionsvolumen: 85 - 135 ml). Die Menge an gebundenem Doxorubicin wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von Doxorubicin bei 495 nm ($\epsilon_{495} = 10\,650\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ bei pH 7,4) bestimmt. Danach sind in diesem Beispiel pro Mol Cystein-Rest im HSA 0,97 Mol Doxorubicin an das HSA gebunden.

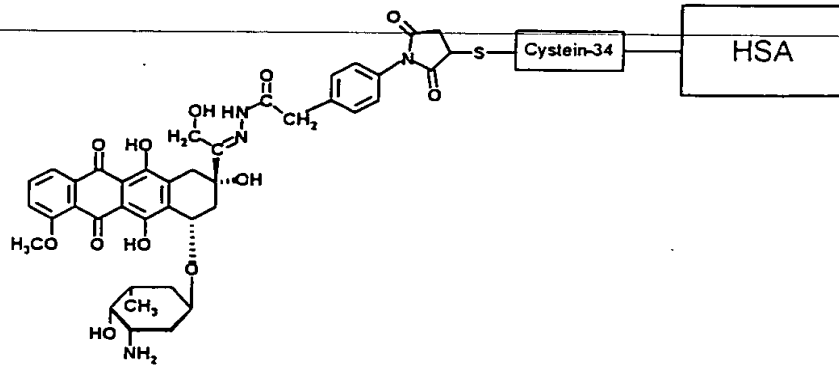
Methoden- FPLC für die Herstellung der Konjugate: P-500 pump, LCC 501 Controller (Pharmacia) und LKB 2151 UV-Monitor. Die Proteinkonzentration des Konjugats wurde photometrisch sowie mit dem BCA-Protein-Essay von Pierce (USA) bestimmt.

Die Reinheit des Konjugats A-DOXO-HYD-C wurde durch HPLC mit Hilfe einer analytischen Säule (Bio-Sil SEC 250, (300 mm x 7.8 mm) von Bio-RAD (mobile Phase: i.d.R. 0.15 M NaCl, 0.01 M NaH₂PO₄, 5% CH₃CN - pH 7.0) bei $\lambda = 495\text{ nm}$ geprüft. Die HPLC-Chromatogramme für A-DOXO-HYD-C und von im Handel erhältlichem nativem Albumin (Immuno GmbH) sind in der Fig. 1A (A-DOXO-HYD-C) und der Fig. 1B (natives Albumin) abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, daß A-DOXO-HYD-C eine dem im Handel erhältlichen nativen Albumin

21

vergleichbare, hervorragende Reinheit aufweist.

Struktur von A-DOXO-HYD-C:



(HSA = humanes Serumalbumin)

Biologische Untersuchungen

Als Beispiel für die *in vivo* Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Konjugate werden die biologischen Daten der HSA-Doxorubicin-Konjugats A-DOXO-HYD-C aufgeführt.

Im sogenannten RENCA (renal cell carcinoma)-Modell wurden Doxorubicin und das erfindungsgemäße Konjugat A-DOXO-HXD-C hinsichtlich der antitumoralen Wirksamkeit bei annähernd äquitoxischer Dosis miteinander verglichen (intravenöse Therapie 10 Tage nach Injektion von etwa 1 Million Nierenkarzinomzellen in die linke Niere).

Tiere: Balb/c- Mäuse, weiblich; **Tumor:** RENCA, renal cell carcinoma

Therapie: Tag(d) 10, 14, 18, 21 intravenös (i.v.), Ende des Versuchs: d 25

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

	Anzahl der Mäuse	Substanz	Dosis (mg/Kg/inj.)	Mortalität (d)	Durchschnittliche Körpergewichts- abnahme (%) d 1 bis 25
--	---------------------	----------	-----------------------	-------------------	---

5	10	Kontrolle		2	- 14
	10	Albumin-Kontrolle	4x1,4 g	1	- 16
	10	Doxorubicin (Doxo)	4x6 mg/kg	1	- 21
	10	A-DOXO-HYD-C	4x12 mg/kg	0	- 18

10

Die Dosis bezieht sich auf die vorhandene Menge Doxorubicin. Die Dosierungen von Doxorubicin und A-DOXO-HYD-C sind annähernd äquitoxisch (siehe Körpergewichtsabnahme in der Tabelle 2).

15

Die Ergebnisse dieses Versuches sind desweiteren in der Fig. 2 hinsichtlich der Gewichte und Volumina der Nieren und Nierentumoren (Fig. 2A) sowie der Gewichte der Lungen und der Anzahl der Lungenmetastasen (Fig. 2B) graphisch dargestellt. A-DOXO-HYD-C zeigt eine sehr gute antitumorale Wirksamkeit und erzielt eine komplette Remission in allen Tieren. Makroskopisch sichtbare Lungenmetastasen konnten nur in einem Tier beobachtet werden (Fig. 2B). Bei der mit Doxorubicin behandelten Gruppe wurden deutlich sichtbare Nierentumoren in allen Tieren beobachtet (Fig. 2A), d.h. bei der optimalen Dosis von Doxorubicin (Körpergewichtsabnahme: -21 % (d 1 bis 25); 1 Tier verstorben) konnten demgegenüber keine kompletten Remissionen erzielt werden. Weiterhin betrug bei den mit freiem Doxorubicin behandelten Mäusen die Anzahl der Lungenmetastasen im Durchschnitt etwa 100 Metastasen pro Maus (Fig. 2B).

25

Anmelder: KTB Tumorforschung GmbH
"Träger-Pharmaka-Konjugate"
Unser Zeichen: K 2573 - py / js

Ansprüche

1. Träger-Pharmakon-Konjugat, umfassend einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren Cystein-Resten, und ein Pharmakon, enthaltend eine pharmazeutisch aktive Substanz, ein Spacermolekül und eine thiolbindende Gruppe, wobei pro Mol Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Träger gebunden sind.
2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Träger natives oder rekombinantes Albumin ist.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül pH-abhängig und/oder enzymatisch spaltbar ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, wobei das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung mindestens eine Peptidbindung enthält.
5. Konjugat nach Anspruch 4, wobei die Peptidbindung innerhalb einer Peptidsequenz vorliegt, welche mindestens eine Spaltsequenz einer Protease enthält.
6. Konjugat nach einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung mindestens eine säurelabile Bindung enthält.

7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die pharmazeutisch aktive Substanz ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein Immunsuppressivum, ein Antirheumatikum, ein Antiphlogistikum oder ein Antimykotikum ist.
- ~~8. Konjugat nach Anspruch 7, wobei das Zytostatikum aus der Gruppe der Anthrazykline, der N-Nitrosoharnstoffe, der Alkylantien, der Purin- oder Pyrimidinantagonisten, der Folsäureantagonisten, der Taxane, der Camptothecine, der Podophyllotoxinderivate, der Vinca-Alkaloide oder der *cis*-konfigurierten Platin(II)-Komplexe ausgewählt ist.~~
9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die thiolbindende Gruppe eine Maleinimidgruppe, eine Halogenacetamidgruppe, eine Halogenacetatgruppe oder eine Pyridyldithio-Gruppe umfaßt, die gegebenenfalls substituiert sind.
10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Spacermolekül einen substituierten oder unsubstituierten, verzweigt- oder unverzweigt-kettigen aliphatischen Alkylrest mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen und/oder mindestens einen substituierten oder unsubstituierten Arylrest umfaßt.
11. Verfahren zur Herstellung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 10, umfassend
- (i) Behandlung des Trägers mit einem Reduktionsmittel, so daß mehr als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Rest im Träger vorliegen und
 - (ii) Kopplung des Pharmakons über die thiolbindende Gruppe an die Cystein-SH-Gruppen im Träger.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Reduktionsmittel Dithiothreitol, Dithioerythritol oder Mercaptoethanol ist.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei das hergestellte Konjugat eine Reinheit von mehr als 95% aufweist.

14. Arzneimittel, enthaltend das Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Hilfsstoff und/oder ein Verdünnungsmittel.
15. ~~Arzneimittel nach Anspruch 14 zur Behandlung von Krebskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Viren und/oder Mikroorganismen verursacht sind.~~

Anmelder: KTB Tumorforschung GmbH
"Träger-Pharmaka-Konjugat "
Unser Zeichen: K 2573 - py / js

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Träger-Pharmaka-Konjugate, umfassend einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren Cystein-Resten, und ein Pharmakon, enthaltend eine pharmazeutisch aktive Substanz, ein Spacermolekül und eine thiolbindende Gruppe, wobei pro Mol Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Träger gebunden sind, sowie Verfahren zu deren Herstellung und Arzneimittel, welche die Konjugate enthalten.

Fig. 1A

RUN# 101. MAR 6. 1901 23:50:33

AREA	RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA
4.461	746394	PV	-413	6.00256	
6.123	234060	VH	-366	1.90754	
6.894	1128972	ISHP	.271	92.00930	

TOTAL AREA=1.2270E+07.
MUL FACTOR=1.0000E+00.

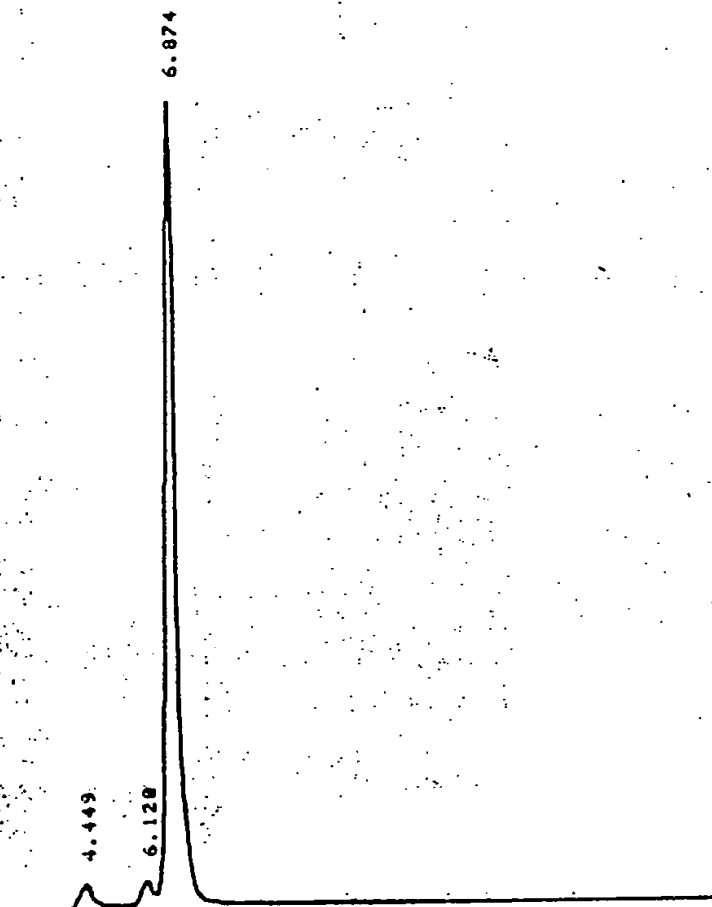


Fig. 1B



STOP

Fig. 2A

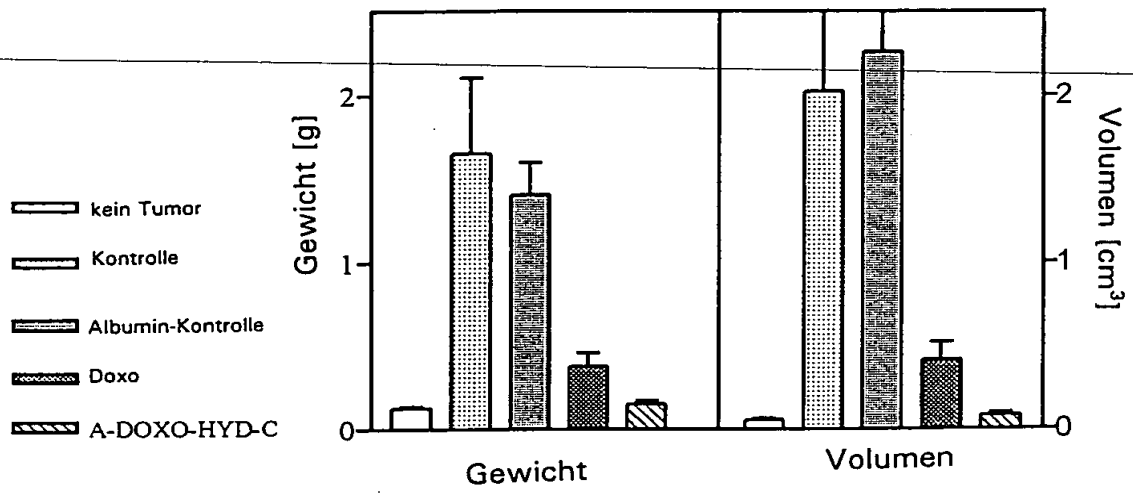


Fig. 2B

